

УДК 543.866

## ВОЗМОЖНОСТИ ГРУППОВОГО И ИНДИВИДУАЛЬНОГО ИММУНОЭКСТРАКЦИОННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Э.П.Медянцева, Р.М.Варламова, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников  
Казанский государственный университет  
420008, Казань, Кремлевская, 18  
Elvina.Medyantseva@ksu.ru

Поступила в редакцию 24 февраля 2006 г.

Предложена методика иммунохимического определения группы триазиновых гербицидов, а также их отдельных представителей в виноградном соке. Рассчитаны количественные характеристики процесса иммуноэкстракции с помощью иммобилизованных антител (ИАт). Оценена возможность концентрирования, исходя из максимальной сорбционной емкости ИАт и аналитических возможностей холинэстеразного биосенсора на основе планарных электродов. Предложен алгоритм иммуноэкстракционного определения группы пестицидов триазинового ряда и их отдельных представителей с помощью ИАт, с последующим детектированием с помощью амперометрического холинэстеразного биосенсора. Область рабочих концентраций составляет  $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-11}$  моль/л.

**Медянцева Эльвина Павловна** – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электроаналитическая химия, ферментативный катализ, биосенсоры, электрокаталитические процессы, иммунохимический анализ

Автор более 160 опубликованных работ

**Варламова Регина Марковна** – аспирант кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Область научных интересов: амперометрические биосенсоры, иммунохимический анализ, анализ объектов окружающей среды, пищевых продуктов, лекарственных препаратов.

Автор 5 опубликованных работ.

**Биккенина Диляра Римовна** – студентка 5 курса кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Автор 2 опубликованных работ

**Будников Герман Константинович** – доктор химических наук, профессор, академик МАНВШ, член-корреспондент РАЕН, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Область научных интересов: электрохимические методы анализа, биосенсоры, модифицированные электроды, экоаналитический контроль.

Автор более 800 опубликованных работ

Разработка достаточно простых, экспрессных и в то же время чувствительных и селективных способов определения широкого круга биологически активных соединений различной природы и происхождения – задача, которая была, есть и будет актуальной еще долгое время.

Зачастую, особенно на стадии предварительных испытаний, нет необходимости определять конкретное соединение, что всегда сопряжено с дополнительными материальными и временными затратами, а можно ограничиться получением данных просто о наличии соединений определенного класса, т.е. получить сигнал «есть – нет», например, относительно потенциальных загрязнителей в анализируемом объекте. Это может послужить основанием для того, чтобы сразу начать принимать соответствующие природоохранные меры, а лишь уже затем, в случае необходимости, уточнить конкретный загрязнитель.

Проблеме анализа пестицидов различных классов, в частности гербицидов сим-1,3,5-триазинового ряда, являющихся потенциальными загрязнителями окружающей среды, посвящено достаточно много работ, причем используются различные приемы, подходы и методы, включая самые современные. Наиболее распространенный вариант – применение разных вариантов хроматографии [1–4] для определения триазиновых пестицидов показывает, что проблема селективного определения того или иного вида пестицидов, особенно в присутствии родственных по структуре и свойствам соединений, существует

до сих пор. Наряду с хроматографическими методами, в настоящее время для анализа пестицидов используют предварительное проведение твердофазной экстракции (например, на волокне из полидиметилсилоксана [5] и дивинилбензола [6], на октадецилсиликагелевых картриджах [7], картриджах со стирол – дивинилбензовым сорбентом [8], полиакрилатном сорбенте [9], в колонке с полимером с молекулярными отпечатками [10], на кремнеземных фазах с октадецидом и катионообменником [11]). Причем твердофазную экстракцию, чаще всего, используют в сочетании с различными вариантами хроматографии [12], масс-спектрометрии [13], микроволновым облучением [14], капиллярным зонным электрофорезом [15]. В то же время, большинство из используемых методов анализа не лишены определенных недостатков: достаточно сложная процедура пробоподготовки, многостадийность и сложность выполнения отдельных стадий, высокая стоимость анализов при использовании современных методов детектирования, возможность неоднозначной интерпретации полученных результатов, необходимость, в связи с этим, высокой квалификации персонала. Все это указывает на необходимость дальнейших разработок новых способов анализа, в частности, пестицидов разных классов.

В настоящее время для определения пестицидов в аналитической практике все чаще используют иммунохимические методы анализа (ИХМ), основанные на специфическом связывании определяемого соединения с соответствующими антителами (Ат). ИХМ обладают высокой чувствительностью, уникальной специфичностью, простотой пробоподготовки (если она требуется), дешевизной оборудования, экспрессностью и возможностью автоматизации. В настоящее время для определения гербицидов группы сим-1,3,5-триазинов используют различные варианты ИХМ: поляризационный флуоресцентный иммуноанализ [16], хемилюминесцентный анализ [17] и варианты твердофазного иммуноферментного анализа - ELISA [18].

Можно ожидать, что сочетание приемов селективной твердофазной экстракции с использованием иммобилизованных антител и чувствительного амперометрического детектирования позволит расширить возможности определения широкого круга физиологически активных соединений. В частности, применение для определения гербицидов иммуноэкстракции с использованием иммобилизованных антител является, на наш взгляд, весьма перспективным, как в теоретичес-

ком, так и в практическом отношении.

Предлагаемые нами варианты иммунохимических определений, включающие твердофазную экстракцию, имеют явные преимущества перед другими методами определения данных соединений: низкий предел обнаружения, простота выполнения анализа, селективность определений, экспрессность и возможность автоматизации. Сочетание иммунологических реакций с участием иммобилизованных Ат против соответствующих соединений, т.е. приемы иммуноэкстракции, с биокаталитическими реакциями, лежащими в основе функционирования биосенсоров, позволяют повысить селективность и чувствительность определений.

В данной работе на примере определения гербицидов сим-1,3,5-триазинового ряда рассмотрены аналитические возможности и условия селективного определения группы (класса) соединений и последующего определения индивидуальных соединений в сложных по составу объектах путем иммуноэкстракции и концентрирования определяемых соединений с помощью иммобилизованных антител и амперометрического холинэстеразного биосенсора.

### Экспериментальная часть

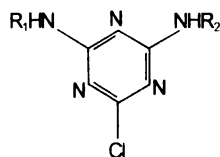
Основой холинэстеразных биосенсоров служила система, состоящая из рабочего, вспомогательного (платина) электродов и серебряного электрода сравнения (фирма BVT Technologies, Брно, Чехия). Материалом поверхности рабочего электрода, на который иммобилизуется холинэстераза (ХЭ), являлась платиносодержащая паста. Объем рабочей ячейки системы составлял 200 мкл. Все измерения с использованием этих электродов проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора «МЕВ» с компьютеризованным управлением.

В качестве субстрата использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ) (Sigma), раствор которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе и использовали в течение не более трех часов. Применяли бутирилхолинэстеразу сыворотки крови лошади (БуХЭ), активностью 29 АЕ/мг, изготовленную НПО «Биомед» (Россия, г. Пермь).

В качестве носителей для иммобилизованных Ат использовали промышленно изготовленные нитратцеллюлозные мембранные фильтры фирмы «Сарториус», Германия (размер пор 0,2 мкм).

Применяли 12,5 %-ный раствор глутарового альдегида фирмы «ICN» и сывороточный альбумин человека (ЧСА) фирмы «Reanal» (Венгрия).

Использовали хроматографически чистые препараты:



где  $R_1, R_2 - C_2H_5$  в случае симазина (2-хлоро-4,6-бис(этиламино)-сим-триазин) и  $R_1 - C_2H_5, R_2 - C_3H_7$  в случае атразина (6-изопропиламино-2-хлоро-4-этиламино-сим-триазин).

Водные растворы симазина и атразина готовили путем их растворения в небольшом количестве метанола, а затем - в бидистиллированной воде.

Применяли поликлональные антитела (Ат) против симазина и атразина, полученные на кафедре химической энзимологии МГУ. Антитела растворяли в бидистиллированной воде. Концентрации водных растворов Ат для симазина и атразина, равные  $0,076 \pm 0,009$  мг/мл, были определены спектрофотометрически при температуре  $25^\circ\text{C}$  ( $\lambda = 280$  нм) с помощью прибора Lambda EZ-210 компании Perkin Elmer (Германия).

Использовали боратный буферный раствор ( $\text{pH} = 9,05 \pm 0,05$ ), трис-буфер ( $\text{pH} = 7,67 \pm 0,05$ ). Значения pH водных растворов определяли pH-метром pH-150 со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

#### *Изготовление холинэстеразного биосенсора на основе планарных платиновых электродов*

Для получения биочувствительной части на поверхность рабочего электрода наносили ХЭ (холинэстеразу), в частности, БуХЭ (бутирилхолинэстеразу) сыворотки крови лошади. Для этого готовили смесь, содержащую раствор фермента с концентрацией 20 нкат/мкл, раствор бычьего сывороточного альбумина, фосфатный буфер (50 мМ,  $\text{pH} = 7,0$ ), дистиллированную воду и раствор глутарового альдегида. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь и, после энергичного перемешивания, на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом биосенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при температуре  $t = +4^\circ\text{C}$ . На следующий день биосенсоры промывали водой, оставляли для высушивания на воздухе и в дальнейшем хранили в холодильнике.

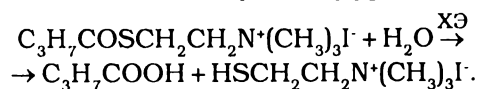
#### *Получение иммобилизованных антител*

Для определения отдельных представителей триазиновых гербицидов получение иммобилизованных антител проводили согласно методике, описанной в работе [19].

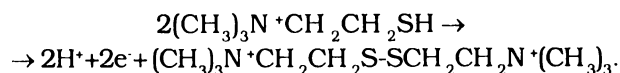
В случае группового анализа для получения иммобилизованных антител на промышленно изготавливаемые мембраны фирмы "Сарториус" с диаметром пор 0,2 мкм наносили смесь из Ат в равном соотношении (1:1). Последующие стадии иммобилизации проводили согласно методике, разработанной для получения ИАт на отдельные представители гербицидов триазинового ряда [19].

#### *Природа формирования аналитического сигнала*

Известно, что ХЭ катализирует реакцию гидролиза тиохолиновых эфиров. БТХИ, являющийся одним из специфичных субстратов бутирилхолинэстеразы, подвергается холинэстеразному гидролизу с образованием электрохимически активного тиола по следующему уравнению:



На печатном платиновом электроде тиол подвергается процессу окисления:



Наибольшее значение тока наблюдается при потенциале  $+0,55$  В. Ток окисления, регистрируемый в потенциостатическом режиме, достигал постоянного значения через 3 мин. Силу этого стабилизировавшегося тока, зависящего от количества продукта ферментативного гидролиза, использовали в качестве аналитического сигнала.

#### **Результаты и их осуждение**

Изучение действия гербицидов атразина и симазина на иммобилизованную ХЭ (ИХЭ), входящую в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора на основе печатных электродов, показало, что в их присутствии наблюдается уменьшение аналитического сигнала, т.е. эти гербициды оказывают ингибирующее действие в диапазоне концентраций от  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $1 \cdot 10^{-10}$  моль/л для атразина и от  $1 \cdot 10^{-7}$  до  $5 \cdot 10^{-12}$  моль/л для симазина.

Установлено, что степень (процент) ингибирования при действии на фермент-субстратную систему БТХИ – ХЭ при использовании холинэстеразных биосенсоров на основе планарных электродов составляет для атразина  $30,0 \pm 0,8$  %, для симазина –  $40,0 \pm 0,6$  %.

Ингибирующее действие изучаемых соединений на каталитическую активность ИХЭ служит основой для использования соответствующего биосенсора для регистрации степени протекания биоспецифического взаимодействия на заключи-

тельной стадии иммуноэкстракционного анализа. Установлено, что холинэстеразные биосенсоры могут быть использованы как для группового, так и специфичного иммуноанализа пестицидов.

Для оценки возможности проведения группового анализа триазиновых пестицидов были использованы модельные растворы, в состав которых входили симазин и атразин при различных соотношениях (1:1 в различных диапазонах концентраций, а также 1:10, 10:1) с использованием холинэстеразных биосенсоров на основе планарных электродов.

В табл. 1 приведены некоторые из полученных результатов, которые показывают, что градуировочные характеристики при совместном определении пестицидов не очень сильно отличаются

друг от друга. Можно лишь отметить, что при соотношении симазин:атразин = 10:1 наблюдались наилучшие параметры градуировочной кривой для определения пестицидов при совместном присутствии (в частности, больший коэффициент чувствительности – наклон градуировочного графика) с помощью холинэстеразного биосенсора. Поскольку при групповом анализе нам необходимо определить лишь принадлежность определяемых соединений к группе тех или иных гербицидов и оценить область рабочих концентраций, возможно использование любого из представленных градуировочных графиков. В дальнейшем, при иммуноанализе использовали, в основном, градуировочный график, полученный для соотношения пестицидов 1:1.

Таблица 1

Аналитические возможности определения триазиновых гербицидов с помощью холинэстеразного биосенсора на основе планарных платиновых электродов

Соотношения гербицидов	Область рабочих концентраций, моль/л	Уравнение градуировочной зависимости $I_p = A + B \lg C$ и коэффициент корреляции $r$			Процент ингибирования
		$A \pm \delta$	$B \pm \delta$	$r$	
Симазин	$1 \cdot 10^{-7} - 5 \cdot 10^{-12}$	$107 \pm 3,5$	$9,1 \pm 0,4$	0,9947	$40,4 \pm 0,6$
Атразин	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-10}$	$33,8 \pm 0,9$	$2,6 \pm 0,1$	0,9984	$30 \pm 1$
Симазин: атразин = 1:1	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-11}$	$46,6 \pm 1,9$	$4,0 \pm 0,2$	0,9939	$22,0 \pm 0,6$
Симазин: атразин = 1:10	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-10}$	$55,5 \pm 0,9$	$4,9 \pm 0,1$	0,9992	$25,4 \pm 0,8$
Симазин: атразин = 10:1	$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-11}$	$79,1 \pm 2,8$	$6,7 \pm 0,3$	0,9953	$37 \pm 1$

Полученные результаты послужили основой для разработки способа иммуноэкстракционного определения пестицидов в анализируемом растворе.

Определение основано на иммуноэкстракции и концентрировании определяемого соединения на поверхности иммобилизованных Ат с последующим определением триазиновых гербицидов с использованием амперометрического холинэстеразного биосенсора. В основу такого определения положены стадии образования и последующего разрушения иммунного комплекса антитело-пестицид.

Основные параметры, характеризующие физико-химические свойства иммуносорбента, от которых зависит эффективность экстракции (и концентрирования) в наших условиях это: степень извлечения (сорбции)  $R$ , %; оптимальное значение pH; сорбционная емкость иммуносорбента  $SE$ , мг/см<sup>2</sup> или мкг/см<sup>2</sup>; время сорбции; коэффициент распределения  $D$  определяемого вещества в системе "раствор-иммуносорбент"; прочность образующихся иммунных комплексов. Не-

которые из этих параметров определены в ходе выполнения этой работы.

Сорбцию триазиновых гербицидов изучали при перемешивании при комнатной температуре. Степень извлечения определяли, оценивая концентрацию гербицида, оставшегося в растворе после инкубации в нем нитроцеллюлозной пленки с иммобилизованными антителами (ИАт) по сравнению с первоначальной.

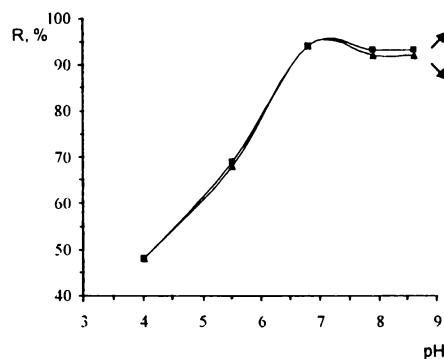


Рис.1. Зависимость степени иммуноэкстракции атразина (1) и симазина (2) от pH раствора

Установлено, что в диапазоне pH от 7 до 8,6 наблюдается практически полное извлечение триазиновых гербицидов из анализируемого раствора даже при однократной иммуноэкстракции (рис. 1). Полученная зависимость показывает, что образование иммунного комплекса лучше всего проводить в нейтральной среде при комнатной температуре.

Время инкубации ИАт в исследуемом растворе, которое варьировали в интервале от 1 до 15 мин, влияет на степень извлечения определяемого соединения. Установлено, что для образования иммунного комплекса пестицид-ИАт необходимо не менее 5 мин (рис. 2), как в случае определения смеси пестицидов, так и их индивидуальных представителей. Дальнейшее увеличение времени инкубации практически не сказывается на степени извлечения иммунных комплексов.

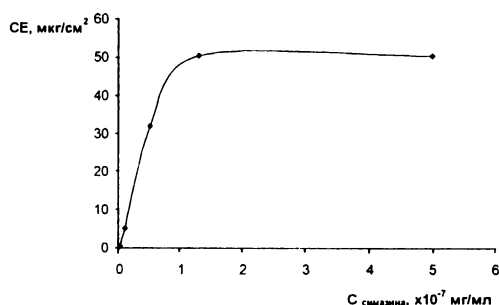


Рис. 3. Зависимость сорбционной емкости иммуносорбента от концентрации атразина

Сорбционную емкость нитроцеллюлозной мембраны оценивали, анализируя содержание атразина на ИАт и в растворе после иммуноэкстракции в оптимальных условиях, меняя количество вводимого соединения.

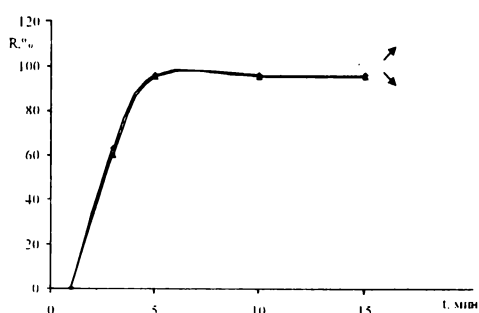


Рис. 2. Зависимость степени экстракции атразина (1) и смеси гербицидов в соотношении 1:1 (2) от времени образования иммунного комплекса

Для характеристики процесса сорбции нами использована изотерма сорбции, построенная в координатах  $CE=f(C)$ , где  $C$  – концентрация гербицида в растворе, а  $CE$  – содержание гербицидов в фазе сорбента, мкг/см<sup>2</sup> (рис. 3). Изотерма сорбции линейна вплоть до точки насыщения (выход кривой на плато) и проекция этой точки на ось ординат совпадает со значением максимальной

сорбционной емкости. Это свидетельствует о том, что процесс сорбции (хемосорбции) при определенной концентрации заканчивается и просто адсорбция триазиновых гербицидов на поверхности иммуносорбента не происходит.

Полученные характеристики иммуносорбента приведены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристики процесса иммуноэкстракции для группового и специфического анализа

Коэффициент распределения		24 – 49
$D$ , мкг/см <sup>2</sup>		
Степень извлечения изучаемых гербицидов $R$ , %		$96 \pm 4$
Максимальная сорбционная емкость ИАт, мкг/см <sup>2</sup>	Групповой анализ	$54,6 \pm 0,9$
	Специфический анализ:	
	симазин	$50,4 \pm 0,6$
	атразин	$50,6 \pm 0,5$

На практически полное извлечение симазина и атразина в выбранных условиях указывает и тот факт, что если в растворе, дополнительно к исследуемым соединениям, присутствует соизмеримая концентрация пропазина (также представитель группы 1,3,5-триазинов), то после иммуноэкстракции всегда наблюдался остаточный ингибирующий эффект иммобилизованной ХЭ, чего не прослеживалось в его отсутствии.

Кроме того, присутствие в анализируемом растворе пестицидов другой группы, в частности, фосфорорганического пестицида паратиона, являющегося ингибитором ХЭ, также позволяет наблюдать остаточный ингибирующий эффект иммобилизованной ХЭ в растворе после иммуноэкстракции триазиновых гербицидов, что не отмечено при контрольных экспериментах в его отсутствии.

Все это указывает, с одной стороны, на практически полное извлечение соединений с помощью соответствующих антител (триазиновые гербициды симазин и атразин), а с другой стороны – на возможность выделения с помощью иммуноэкстракции именно конкретной группы пестицидов. Таким образом, наличие и использование соответствующих иммобилизованных антител делает возможным проведение группового иммуноанализа, что позволяет получить определенную информацию об анализируемом объекте неизвестного состава.

Полученные результаты показывают, что разработанные приемы иммуноэкстракционного разделения, выделения изучаемых соединений и их последующего определения позволяют предложить алгоритм проведения анализа раствора с неизвестным составом на содержание пестицидов раз-

личных классов с помощью иммобилизованных антител и биосенсоров. На наш взгляд, эти приемы и подходы имеют универсальный характер и могут быть использованы для идентификации как группового, так и специфического анализа широкого круга биологически активных соединений.

*Алгоритм иммуноэкстракционного определения пестицидов различных классов в образце неизвестного состава с помощью иммобилизованных антител и амперометрического холинэстеразного биосенсора*

#### 1. Оценка объекта анализа

1.1. Оценить присутствие возможных компонентов в анализируемом образце (в нашем случае – пестициды каких классов могут присутствовать в образце) путем изучения предыстории объекта анализа и его состояния на момент исследования.

1.2. Выяснить влияние предполагаемых искомых соединений на каталитическую активность ферментов, входящих в состав биочувствительной части биосенсоров, имеющихся в наличии (в нашем случае это холинэстеразный биосенсор).

2. Получение иммобилизованных антител против определяемого класса пестицидов т.е. обладающих групповой специфичностью (фосфорсодержащих, карбаматных, хлорсодержащих, серосодержащих, триазиновых и т.д.).

#### 3. Идентификация группы пестицидов.

3.1. Провести иммуноэкстракцию с помощью иммобилизованных антител против определенного класса соединений.

3.2. Проверить полноту экстракции определяемых соединений.

3.3. Разрушить иммунные комплексы, образующиеся на поверхности мембраны с иммобилизованными антителами.

3.3.1. Подобрать реагенты, обеспечивающие достаточно полное разрушение иммунных комплексов без разрушения химической структуры самого определяемого соединения.

3.3.2. Проверить полноту разрушения иммунных комплексов.

3.4. Определить соединения, относящихся к данной группе пестицидов с помощью биосенсоров.

3.5. Провести идентификации другой группы пестицидов, используя другие специфические ИАТ, проведя все предшествующие операции (3.1-3.4).

#### 4. Проведение специфического иммуноэкстракционного анализа.

4.1. Получить иммобилизованные антитела против отдельных представителей класса пестицидов, которые обеспечили положительный эффект в ходе операций 3.1-3.4.

4.2. Использовать иммобилизованные антитела для выделения конкретного соединения из анализируемой смеси.

4.3. Разрушить иммунные комплексы, образующиеся на поверхности мембраны с иммобилизованными антителами.

4.4. Определить конкретное соединение, относящееся к исследуемой группе пестицидов, для чего использовать условия получения максимального аналитического сигнала при работе с соответствующим биосенсором.

4.5. Повторить операции по идентификации конкретных пестицидов, входящих в эту группу соединений (стадии 4.1-4.5).

**Таблица 3**

Аналитические возможности концентрирования при определении микроколичеств триазиновых гербицидов ( $n = 3$ ,  $P = 0,95$ )

Концентрация исходного раствора, моль/л	Объем исходного раствора, мл	Концентрация раствора после концентрирования (теоретическая), моль/л	Найдено, концентрация раствора после концентрирования, моль/л	$S_r$	Степень концентрирования
Симазин - $10^{-10}$	25	$5 \cdot 10^{-9}$	$(4,6 \pm 0,8) \cdot 10^{-10}$	0,153	5
	35	$7 \cdot 10^{-9}$	$(7,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-10}$	0,132	7
	100	$2 \cdot 10^{-8}$	$(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-9}$	0,124	20
	500	$1 \cdot 10^{-7}$	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$	0,169	100
	1000	$2 \cdot 10^{-7}$	$(2,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$	0,210	200
(Симазин: атразин = 1:1) - $1 \cdot 10^{-9}$	25	$5 \cdot 10^{-9}$	$(4,8 \pm 0,7) \cdot 10^{-9}$	0,156	5
	35	$7 \cdot 10^{-9}$	$(7,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-9}$	0,134	7
	100	$2 \cdot 10^{-8}$	$(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$	0,121	20
	500	$1 \cdot 10^{-7}$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,171	100
	1000	$2 \cdot 10^{-7}$	$(1,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$	0,212	200

Установлено, что наряду с идентификацией группы пестицидов существует возможность кон-

центрирования триазиновых гербицидов из их разбавленных растворов (в области concentra-

ций  $10^{-10}$ – $10^{-9}$  М) с помощью иммобилизованных антител как в случае определения отдельных пестицидов, так и их смеси (табл. 3).

Иммуноэкстракцию и концентрирование гербицидов в виде комплекса «Ат – пестицид» проводили, используя растворы гербицидов с концентрацией  $10^{-10}$ – $10^{-9}$  М из объема 25, 35, 100, 500, 1000 мл.

Установлено, что при последующем переводе сорбированных на нитроцеллюлозном фильтре триазиновых гербицидов из  $10^{-9}$  М раствора в объем 5 мл для последующего определения возможно концентрирование в 5 (из 25), 7 (из 35), 20 (из 100), 100 (из 500), 200 (из 1000 мл) раз. Возможности концентрирования при специфичном анализе отдельных представителей рассмотрены на примере симазина из  $10^{-10}$  М растворов.

Пестициды триазинового ряда атразин и симазин являются одними из наиболее эффективных и потому широко применяемых гербицидов. ПДК атразина и симазина, установленные для этих пищевых продуктов, довольно низкие, в некоторых продуктах (ягодах, молоке и воде) их присутствие вообще не допускается. Такие жесткие требования обусловлены тем, что эти гербициды характеризуется длительным периодом сохранения своих свойств в почве [20]. Поэтому существует необходимость разработки чувствительных и надежных методов определения пестицидов в продуктах питания.

Для определения триазиновых гербицидов разработаны методики определения их с помощью иммобилизованных Ат против триазиновых гербицидов и амперометрического биосенсора на основе печатных электродов в виноградном соке.

Для проведения иммуноэкстракционного определения триазиновых гербицидов, образцы сока предварительно разбавляли в 10 раз. Данная процедура проводилась для того, чтобы уменьшить возможные матричные влияния и добиться максимально возможного извлечения пестицида с помощью ИАт.

#### *Методика определения триазиновых гербицидов в виноградном соке*

##### *а) Групповой анализ*

Нитроцеллюлозные мембраны с иммобилизованными на них Ат против симазина и атразина (1:1) помещали в 25–1000 мл исследуемого раствора и инкубировали при перемешивании 5 мин. Затем мембраны с образовавшимся иммунным комплексом промывали дистиллированной водой и помещали в раствор для разрушения иммунного комплекса (0,02 М HCl, 0,15 М NaCl) с объемом 5 мл. После инкубирования с перемешива-

нием в течение 20 мин отбирали 20 мкл аликвоты раствора, содержащего пестициды, и помещали в электрохимическую ячейку с 160 мкл боратного буфера и 20 мкл БТХИ. С помощью холинэстеразного биосенсора определяли концентрацию триазиновых гербицидов, после разрушения иммунного комплекса по градуировочному графику.

Наличие ингибирующего эффекта ИХЭ указывает на наличие пестицидов данной группы в анализируемом образце.

На данном этапе анализа не требуется точное определение концентрации определяемых соединений. Для оценки примерного содержания триазиновых гербицидов в образце использовали один из градуировочных графиков, в частности, полученный для смеси изучаемых гербицидов (1:1):  $I_p = (46,6 \pm 1,9) + (4,0 \pm 0,2) \cdot \lg C$ . Это позволило оценить область концентраций этих соединений в образце:  $1 \cdot 10^{-11}$ – $1 \cdot 10^{-6}$  М.

Следующим этапом в анализе образцов сока являлось определение отдельных представителей триазиновых гербицидов (симазина и атразина) в образцах.

##### *б) Специфичный анализ.*

Для идентификации как атразина, так и симазина нитроцеллюлозные мембраны с иммобилизованными на них Ат против симазина или атразина помещали в 25–1000 мл исследуемого раствора и инкубировали при перемешивании. Затем мембраны с образовавшимся иммунным комплексом промывали дистиллированной водой и помещали в раствор для разрушения иммунного комплекса (0,02 М HCl, 0,15 М NaCl). После инкубирования с перемешиванием в течение 20 мин отбирали аликвоту раствора, содержащего пестицид, и помещали ее в электрохимическую ячейку с боратным буфером и БТХИ. С помощью холинэстеразного биосенсора определяли концентрацию симазина или атразина, после разрушения иммунного комплекса по градуировочному графику.

Методом «введено-найденно» установлено, что определение гербицидов триазинового ряда в образцах сока возможно по градуировочному графику, построенному при использовании для их определения водных растворов. Это говорит о том, что в исследуемых условиях влияние матричных компонентов образца практически не сказывается. В качестве модельных образцов использовали виноградный сок с введенными в определенной концентрации триазиновыми гербицидами. Модельные образцы были приготовлены на основе стерилизованных соков «Я» (г. Лебедянь, Липецкая область) и соков «Добрый» (г. Щелково, Московская область), изготовленных из концен-

трированного виноградного сока. Предварительными исследованиями было установлено, что используемые соки не содержали изучаемые гербициды: после иммуноэкстракции с помощью ИАт против триазиновых гербицидов величина отклика холинэстеразного биосенсора имела такое же значение, что и в отсутствие аликвоты сока.

Модельные образцы сока с содержанием изучаемых гербицидов в интервале концентраций  $5 \cdot 10^{-7}$ – $5 \cdot 10^{-11}$  моль/л были использованы при нахождении градуировочных зависимостей с целью применения холинэстеразных биосенсоров различной конструкции при сопоставлении полученных результатов (табл. 4).

Таблица 4

Иммунохимическое определение триазиновых гербицидов в виноградных соках с помощью ИАт и амперометрических холинэстеразных биосенсоров различной конструкции  
( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ )

Образец	Групповой анализ						
	Введено, моль/л	Амперометрические холинэстеразные биосенсоры				Коэффициент Фишера $F_{\text{расч}}$ ( $F_{\text{табл}} = 6.39$ )	Коэффициент Стьюдента $t_{\text{расч}}$ ( $t_{\text{табл}} = 2.78$ )
		Стационарный ртутно-пленочный электрод		Платиновый планарный электрод			
		Найдено, моль/л	$S_r$	Найдено, моль/л	$S_r$		
Виноградный сок «Я»	$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,030	$(6,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,029	1,01	1,73
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(5,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,039	$(5,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	0,019	3,76	2,00
	$3 \cdot 10^{-7}$	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,074	$(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,077	1,00	1,32
Виноградный сок «Добрый»	$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,030	$(6,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,030	0,98	1,25
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	0,067	$(4,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,043	2,20	1,61
	$3 \cdot 10^{-7}$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,071	$(3,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	0,086	0,44	2,28
Специфический анализ							
Виноградный сок «Я»	$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,030	$(6,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	0,014	4,33	1,57
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	0,065	$(5,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	0,038	1,96	2,73
	$3 \cdot 10^{-7}$	$(2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,074	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,069	1,00	1,54
Виноградный сок «Добрый»	$7 \cdot 10^{-7}$	$(6,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,031	$(6,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,029	1,03	1,22
	$5 \cdot 10^{-7}$	$(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	0,067	$(4,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,042	2,27	0,74
	$3 \cdot 10^{-7}$	$(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	0,077	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-7}$	0,080	1,00	1,41

Таким образом, к отличительным особенностям предлагаемого способа группового и специфического иммуноэкстракционного анализа пестицидов в пищевых продуктах следует отнести высокую селективность и чувствительность определения. Выбранная схема и условия проведения такого варианта иммунохимического анализа позволяют проводить определение достаточно быстро и с минимальным количеством необходимых опера-

ций. Во многих случаях такой вариант иммуноопределения отличает отсутствие многостадийной и сложной пробоподготовки образцов. В целом, аналитические характеристики предлагаемого способа иммуноэкстракционного определения позволяют говорить о перспективности его дальнейшего практического применения, а также расширении области использования для определения широкого круга соединений различной природы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зенкевич И.Г. Выбор оптимальных аналитических параметров для хроматографической характеристики пестицидов / И.Г.Зенкевич, О.К.Остроухова, В.И.Долженко // Журн. анал. химии. 2002. Т.57, №1. С.43-48.
2. Tuzimski T. Correlation of retention parameters of pesticides in normal- and reversed-phase systems and their utilization for the separation of a mixture of 14 triazines and urea herbicides by means of two-dimensional thin-layer chromatography / T.Tuzimski, E.Soczewinski //

- J. Chromatogr. A. 2002. V.961, № 2. P.277-283.
3. Ранский А.П. Хроматографический анализ вторичных растворов регенерации пестицидов атразин изеазин-50. / А.П.Ранский, А.В.Сандомирский, О.В.-Гайдидей // Вопр. химии и хим. технол. 2003. №4. С.50-53, 181, 187.
4. Baglio D. Atmospheric pressure ionization multiple mass spectrometric analysis of pesticides / D.Baglio, D.Kotzias, BR.Larsen. // J. of Chromatography. 1999.



V.854, № 1-2. P.207-220.

5. Asperger A. Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction – liquid chromatography – tandem mass-spectrometry, using turbulent-flow chromatography, columns for enrichment and a short monolithic column for last liquid chromatographic separation. / A.Asperger, J.Efer, T.Koal, W.Engewal // J. Chromatogr. A. 2002. V.960, №1-2. P.109-119.
6. Moreira V.J. Fast screening determination of some ubiquitous pesticides with SPME in water samples. / V.J. Moreira, E. Komatsu // Anal. Lett. 2004. V.37. P.1427-1436.
7. Bermejo E. Multiresidue analysis of S-triazine herbicides in environmental water by micellar electrokinetic capillary chromatography. / E.Bermejo, J.A.Perez, M.Moreno // J. Liq. Chromatogr and Relat. Technol. 2001. V.24, № 4. P.461-478.
8. Gfrerer M. Occurrence of triazines in surface and drinking water of Lianing Province in Eastern China. / M.Gfrerer, T.Wenz, X.Quah, B.Platzer, E.Lankmayr // J. Biochem. Biophys. 2002. V.53, №1-3. P.217-228.
9. Shengye J. Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH – sensitive fluorescence probe / J.Shengye, X.Zhaochao, C.Jiping // Anal. Chim. Acta. 2004. V.523, №1. P.117-123.
10. Nogueira J.M.F. Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. / J.M.F.Nogueira, S.Tom, S.Pat. // Anal. Chim. Acta. 2004. V.505, №2. P.209-215.
11. Trajkovska V. Development and optimization of a method for the determination of simazine, atrazine and propazine using solid-phase extraction and HPLC/GC. / V.Trajkovska, S.Petrovska-Jovanovic, M.Cvetkovski. // J. Serb. Chem. Soc. 2001. V.66, №3. P.199-204.
12. Colume Al. Evaluation of an automated solid-phase extraction system for the enrichment of organochlorine pesticides from waters. / A.Colume, S.Cardenas,

M.Callego. / Talanta. 2001. V.54, №5. P. 943-951.

13. Kuivinen J. Solid-phase extraction of organophosphorus pesticide residues in bovine muscle with gas chromatographic detection. / J.Kuivinen, S.Bengtsson // J. Chromatogr. Sci. 2002. V.40, №7. P.352-396.
14. Lopez F.J. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid-phase microextraction. / F.J.Lopez, E.Pitarch, S.Egea, J.Beltran, F.Hernandez // Anal. Chim. acta. 2001. V.433, №2. P. 217-226.
15. Ballesteros E. Continuous solid-phase extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters. / E.Ballesteros, M.J.Parrado. // J. Chromatogr. A. 2004. V.1029, №1-2. P.267-273.
- 16 Samsonova J.V. Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish peroxidase as a label / J.V.Samsonova, M.Yu.Rubtsova, A.V.Kiseleva, A.A.Ezhov, A.M.Egorov // Biosensors. Bioelectron. 1999. V.14. P.273-281.
17. Yokoyama, K. Highly sensitive quartz crystal immunosensors for multisample detection of herbicides.[Text] / K.Yokoyama, K.Ikebukuro, E.Tamiya, I.Karube, N.Ichiki, Y.Aricawa // Analyt. Chim. Acta. 1995. V.304. P.139-145.
18. Yazynina E.V. Microplate immunoassay technique using polyelectrolyte carriers:kinetic studies and application to detection of the herbicide atrazine / E.V.Yazynina, A.V.Zherder, B.B.Dzantiev, V.A.Izumrudov, S.J.Gee, B.D.Hammock // Analyt. Chim. Acta. 1999. V.399, №1-2. P.151-160.
19. Медянцева Э.П. Иммуноэкстракционное концентрирование и определение симазина как представителя гербицидов группы сим – 1,3,5 – триазинов / Э.П.Медянцева Р.М.Варламова, Д.Р.Биккенина, Г.К.Будников // Прикладная химия. 2005. Т.78, №7. С.1122-1126.
20. Каспаров В.А. Применение пестицидов за рубежом / В.А.Каспаров, В.К.Промоненков.М.: ВО Агроиздат, 1990. 224 с.

\* \* \* \* \*

#### POSSIBILITY OF THE GROUP AND INDIVIDUAL IMMUNOEXTRACTION DETERMINATION OF TRIAZINE HERBICIDES WITH AMPEROMETRIC DETECTION

E.P.Medyantseva, R.M.Varlamova, D.R.Bikkenina, H.C.Budnikov

*The approach of the immunochemical assay as the group of triazine herbicides as the individual compounds in the grape juice has been proposed. The quantitative characteristics of the immunoextraction process using the immobilized antibodies (IAb) have been calculated. The ability of concentration proceeding from the maximum sorption capacity of the immobilized antibodies and analytical possibilities of the cholinesterase biosensor based on the screen-printed electrodes has been estimated. The algorithm of the immunoextraction determination of the group of triazine pesticides as well as the individual compounds using the IAb with following detection by the amperometric cholinesterase biosensor has been proposed. The range of the working concentrations is  $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-11}$  mol/l.*